

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1926

N° 11

---

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

---

*Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1926*

PAR

**METTEY (PAUL)**

*né le 2 Mars 1883, à Dampierre-les-Bois (Doubs)*

---

L'État actuel de nos connaissances

SUR LE

diagnostic du charbon bactérien

---

ÉTUDE CRITIQUE ET EXPÉRIMENTALE

---

JURY

*Président* : M. BEZANÇON, Professeur à la Faculté de Médecine.

*Assesseurs* :

M. VALLÉE, Directeur du Laboratoire de Recherches des Services sanitaires

M. PANISSET, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

---

DESCLÉE, DE BROUWER & C<sup>ie</sup>

LILLE. — 41, Rue du Metz, 41. — LILLE

1926



**L'État actuel de nos connaissances  
sur le diagnostic du charbon bactéridien**

---

**ÉTUDE CRITIQUE ET EXPÉRIMENTALE**



ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1926

N° .....

# THÈSE

POUR LE

## DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

*Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1926*

PAR

**METTEY (PAUL)**

*né le 2 Mars 1883, à Dampierre-les-Bois (Doubs)*

## L'État actuel de nos connaissances

SUR LE

## diagnostic du charbon bactérien

ÉTUDE CRITIQUE ET EXPÉRIMENTALE

### JURY

*Président* : M. BEZANÇON, Professeur à la Faculté de Médecine.

*Assesseurs* :

M. VALLÉE, Directeur du Laboratoire de Recherches des Services sanitaires.

M. PANISSET, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

DESCLÉE, DE BROUWER & C<sup>ie</sup>

LILLE. — 41, Rue du Metz, 41. — LILLE

1926

# Personnel Enseignant de l'École Vétérinaire d'Alfort



*Directeurs Honoraires* : MM. H. VALLÉE et P.-J. CADIOT.

*Directeur* : M. E. NICOLAS.

*Professeurs honoraires* :

MM. G. BARRIER, *Inspecteur général honoraire des Écoles Vétérinaires*,

A. RAILLIET, H. VALLÉE, P.-J. CADIOT.

## Professeurs

|                                                                                                                                         | MM.        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Anatomie descriptive des mammifères domestiques . . . . .                                                                               | BOURDELLE. |
| Physiologie, thérapeutique générale, matière médicale . . . . .                                                                         | MAIGNON.   |
| Physique et chimie médicales, toxicologie, pharmacie . . . . .                                                                          | NICOLAS.   |
| Parasitologie et maladies parasitaires, clinique ; histoire naturelle médicale . . . . .                                                | HENRY.     |
| Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique ; sémio-<br>logie et propédeutique, jurisprudence . . . . .                | ROBIN.     |
| Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique ; ana-<br>tomie chirurgicale, médecine opératoire et ferrure . . . . . | COQUOT.    |
| Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique ;<br>médecine opératoire, obstétrique . . . . .                         | MOUSSU.    |
| Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police<br>sanitaire, clinique . . . . .                                  | PANISSET.  |
| Histologie et embryologie, anatomie pathologique, inspection des<br>denrées alimentaires ; autopsies . . . . .                          | PETIT.     |
| Hygiène et agronomie ; zootechnie et économie rurale . . . . .                                                                          | DECHAMBRE. |

## Chefs de Travaux

MM. DELMER.

LEBLOIS.

LESBOUYRIES.

MONVOISIN.

MM. MOUSSU (R.)

PETIT (M.)

VERGÉ.



La Faculté de Médecine et l'École Vétérinaire déclarent que les opi-  
nions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être  
considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur  
donner ni approbation, ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE,

A MON PÈRE,

A MA FEMME,

A MON FILS,

A MES SŒURS,

A MON COUSIN WAUCAMPT,

A MES PARENTS.

A MES AMIS.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR BEZANÇON

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,  
COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR.

*Nous le remercions d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider notre thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VALLÉE,

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,  
MEMBRE DU CONSEIL SUPÉRIEUR D'HYGIÈNE PUBLIQUE DE FRANCE,  
DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE RECHERCHES DES SERVICES  
VÉTÉRINAIRES DU MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE,  
COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR.

*En témoignage de reconnaissance et d'admiration d'un de ses premiers élèves.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PANISSET

AUDITEUR AU CONSEIL SUPÉRIEUR D'HYGIÈNE PUBLIQUE DE FRANCE,  
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

*En souvenir de l'amitié qui nous a unis dès le début de mes études. Qu'il trouve ici l'expression d'une bien cordiale reconnaissance ; sans ses conseils nous n'aurions pas pu mener à bien ce travail.*



## AVANT-PROPOS

Les hasards d'une épidémie de fièvre charbonneuse dans un effectif de cavalerie dont nous avions la charge des soins, nous ont conduit à l'étude du diagnostic expérimental de la maladie. Quelques essais nous ont convaincu de la complexité du problème et nous nous sommes mis résolument à la recherche de la solution. A défaut de laboratoire bien outillé, à défaut aussi d'une spécialisation technique suffisante, plus encore en l'absence d'un Maître pour nous guider, nos efforts ont porté surtout sur des recherches bibliographiques. Il nous a fallu peu de temps pour nous persuader que le problème était complexe pour tous, que les bactériologistes lui proposaient des solutions, en apparence, les plus diverses. C'est une mise au point de tout ce que l'on trouve dans les traités et dans les revues que nous avons tenté de présenter dans le présent travail ; nous ne nous sommes pas borné à rassembler les travaux publiés, nous avons essayé de faire le départ entre les bons et les mauvais procédés et nous nous sommes attaché à vérifier la valeur de quelques-uns d'entre eux, mais c'est seulement l'étude du procédé de séro-précipitation d'Ascoli que nous avons considérée comme apportant un élément original et nouveau au diagnostic expérimental de la fièvre charbonneuse.

\* \* \*

Les recherches sur la fièvre charbonneuse et sur la bactériémie charbonneuse depuis l'avènement de la bactériologie sont innombrables ; pour la plupart elles constituent

les bases expérimentales de la pathologie des maladies infectieuses et de la microbiologie. Et pourtant, le diagnostic expérimental de la fièvre charbonneuse, en dépit de son apparente facilité, est particulièrement embarrassant ; l'observation scrupuleuse des principes de la méthode expérimentale et des règles de la technique ne permet pas toujours de mettre en évidence *Bacillus anthracis* dans les organes des animaux qui ont succombé à l'infection.

Il est à peine besoin d'insister sur l'intérêt de formuler un diagnostic précis. Avant d'appliquer des méthodes préventives spécifiques, avant d'exiger la destruction complète des cadavres, il est indispensable de connaître exactement la nature de la maladie. La découverte des agents infectieux, en perfectionnant nos procédés thérapeutiques et prophylactiques, a transformé nos méthodes de diagnostic. La nature véritable d'une maladie ne peut être déterminée scientifiquement que par la découverte de l'agent causal. Cette exigence assure seule la précision du diagnostic, mais elle le rend plus complexe.

Le charbon bactérien n'échappe pas à cette règle générale. Alors que les anciens praticiens n'hésitaient pas à reconnaître le *sang de rate* par les seuls moyens de l'observation, actuellement la mise en œuvre des procédés expérimentaux du diagnostic devient nécessaire, elle s'impose même pour affirmer l'existence du charbon, tout au moins pour reconnaître la nature du premier cas. L'association de l'observation et de l'expérimentation a montré, en effet, que des maladies, différentes du charbon, peuvent évoluer de la même façon et fournir à l'autopsie, un tableau anatomo-pathologique qui prête à confusion.

En dehors de la nécessité scientifique de démontrer l'existence de la bactérie charbonneuse, il est des cas où les moyens expérimentaux permettent seuls d'arriver à un résultat certain. Dans les cas en apparence spontanés, l'observation judicieuse des malades est insuffisante pour rattacher à leur véritable cause les signes de coli-

ques, même avec élévation de température, qui constituent les manifestations cardinales de la maladie.

L'autopsie permet le plus souvent de porter le diagnostic. Pourtant lorsque les animaux ont été sacrifiés d'urgence, les lésions caractéristiques peuvent faire défaut : l'altération du sang manque le moins souvent, mais elle n'acquiert toute sa valeur diagnostique que par la coexistence de la tuméfaction de la rate et de la teinte saumonée des muscles.

Et si le praticien n'a plus à sa disposition que les « quartiers » des animaux sacrifiés, la modification de la coloration des muscles ne constitue pas à elle seule un signe pathognomonique du charbon ; cette altération peut être rencontrée dans un grand nombre d'états pathologiques différents du charbon bactérien.

Autant de cas qui montrent que le diagnostic du charbon ne peut être assuré que par l'analyse bactériologique, soit par la recherche directe de la bactériémie, par la culture, l'inoculation ou les procédés de la sérologie.

## A

### RECHERCHE DIRECTE DE LA BACTÉRIEMIE.

Si l'autopsie est pratiquée aussitôt après la mort, l'examen du sang sans coloration montre presque toujours, à un grossissement de 4 ou 500 diamètres, les altérations histologiques de ce milieu et la présence des bactéries. Les globules rouges sont confondus en amas irréguliers, leur contour est mal délimité, les globules blancs sont plus nombreux que dans le sang normal. Les bactéries se voient dans les espaces libres sous la forme de bâtonnets rigides, incolores et très réfringents.

Les préparations effectuées avec la pulpe de la rate, des reins ou des ganglions hypertrophiés recèlent les microbes en abondance.

La coloration renseigne sur les *caractères morphologiques*, les *propriétés histo-chimiques*, les *particularités* des bacilles observés et permettent de les identifier à la bactéridie charbonneuse.

La fuchsine en solution hydro-alcoolique à 1 %, le bleu de méthylène, la thionine phéniquée montrent dans le sang et les pulpes d'organes des bâtonnets isolés ou réunis en chaînettes de plusieurs articles. Chaque bâtonnet d'une longueur de 5 à 20  $\mu$  et d'une largeur de 1  $\mu$  à 1  $\mu$  5 est constitué par une série de masses protoplasmiques, de 1  $\mu$  5 à 2  $\mu$  de longueur, placées bout à bout. Les extrémités libres du bâtonnet sont très légèrement arrondies, tandis que les extrémités de chacune des masses qui le constituent sont coupées perpendiculairement. On peut noter aussi très souvent un léger renflement des extrémités de chaque article d'où il résulte pour l'ensemble du filament l'aspect d'un bambou. Les espaces, à peine teintés, qui existent entre les éléments du filament, sont le plus souvent en forme de lentille biconvexe, en raison de la petite dépression qui existe au niveau des extrémités de chaque article.

Les éléments qui constituent la *bactéridie* avec ses caractéristiques morphologiques sont généralement considérés comme des cellules bactériennes et chacune d'elles représente une bactéridie.

### Mise en évidence de la gaine.

La bactéridie, dans le sang et les tissus, est encore caractérisée par la présence d'une capsule qui entoure le bâtonnet et semble former une gangue protoplasmique, servant de support aux différents articles (Sérafini (1888), Pianese, Johnne...)

Dans les préparations colorées avec les solutions hydro-alcooliques usuelles, la gaine de la bactéridie non colorée ou très faiblement teintée se distingue quelquefois assez nettement de la partie centrale fortement colorée. Les

résultats sont plus certains avec l'une des méthodes spéciales recommandées pour la mise en évidence de ce détail d'organisation <sup>1</sup>.

**MÉTHODE DE JOHNE :** La préparation obtenue suivant les règles ordinaires, parfaitement séchée à l'air (plusieurs heures) est fixée par la chaleur en passant trois fois dans la flamme. La coloration est faite avec une solution hydro-alcoolique de violet de gentiane à 2 %, en chauffant 15 à 20 secondes jusqu'à dégagement de premières vapeurs. Lavage à l'eau et action rapide (8-10 secondes) d'une solution aqueuse d'acide acétique à 2 %, lavage prolongé à l'eau. Dessiccation.

Les bactériidies sont colorées en violet foncé, la gaine prend une légère teinte violette.

**MÉTHODE DE KLETT.** — *Coloration simple.* — La préparation est fixée en passant trois fois dans la flamme, colorée rapidement par la fuchsine ou le violet de gentiane (ou de méthyle), lavée à l'eau. Pour obtenir la différenciation, on recouvre la lame d'eau distillée et on porte au-dessus de la flamme jusqu'à dégagement de premières vapeurs ; ce lavage à l'eau distillée chaude est renouvelé 8-10 ou 12 fois. Pour terminer, lavage prolongé à l'eau, dessiccation.

*Double coloration.* — La préparation fixée par la chaleur colorée à chaud par le bleu de méthylène en solution hydro-alcoolique à 1 % est différenciée par 10 ou 12 lavages, à l'eau distillée chaude. La coloration de contraste est obtenue par l'action rapide de la fuchsine (1 %). Lavage à l'eau, dessiccation.

Les bactériidies sont colorées en bleu, la gaine prend une légère teinte rose, mais son contour est dessiné par une ligne rouge foncé.

---

<sup>1</sup>. Les détails de cette technique sont empruntés au Précis de microbiologie des maladies infectieuses des animaux de J. Courmont et L. Panisset. Doin, Ed<sup>r</sup>, Paris 1914.

MÉTHODE DE LÜPKE. — Par la coloration à chaud avec une solution de violet de gentiane à 0, 2 % la gaine se distingue très bien du corps de la bactériodie sans aucune différenciation.

MÉTHODE DE OLT. — Coloration à chaud, 1 ou 2 minutes, avec la safranine à 2-3 %. La partie centrale des bâtonnets prend une teinte rouge brun, la gaine est colorée en jaune et son contour dessiné par une ligne rouge brun.

MÉTHODE DE RÄBIGER. — La préparation séchée à l'air est fixée et colorée par une solution formolée de violet de gentiane pendant 20 secondes. Lavage à l'eau, dessiccation. Les bacilles sont colorés en violet foncé, la capsule en bleu avec un contour bien marqué.

La solution colorante de Rübiger se prépare en dissolvant 10-15 gr. de violet de gentiane dans 100-150 gr. de formol à 40 % ; on laisse en contact, une nuit, la dissolution n'est pas complète, après filtration la solution convient pour la coloration.

On peut fixer la préparation par le formol et la colorer ultérieurement par le violet de gentiane à 2 % (Preusse).

La méthode de Rübiger et ses modifications ont été préconisées pour obvier aux inconvénients des procédés antérieurs qui utilisent la fixation par la chaleur. Ce mode de fixation provoquerait une rétraction du protoplasma bactérien et serait capable de montrer, après coloration, une capsule qui ne serait qu'une altération de la préparation. La fixation au formol évite la formation des pseudo-capsules.

MÉTHODE DE FRANK : On colore 20 secondes par l'éosine aqueuse à 0,5 % et 10 secondes dans le bleu de méthylène à 0, 45 %.

Sans recourir aux méthodes préconisées exclusivement pour la coloration de la bactériodie charbonneuse, on peut utiliser plus simplement les solutions polychromatiques

comme la *thionine phéniquée*, la *bleu de Unna* ou les méthodes générales de double coloration (*Romanowsky*), *Giemsa*...) Foth<sup>1</sup> a montré les avantages de divers bleus Azur qui entrent dans la composition des colorants inspirés de la formule primitive de Romanowsky.

RÉACTION AU BLEU DE MÉTHYLÈNE DE M'FADYEAN. — Des méthodes de coloration de la gaine de la bactéridie charbonneuse, il faut rapprocher la réaction particulière provoquée par la coloration, au bleu de méthylène, dans le sang des animaux charbonneux. Cette particularité intéressante pour le diagnostic du charbon, est le plus souvent désignée sous le nom de *réaction de M'Fadyean* ou de réaction au bleu de méthylène (*methylene blue reaction*).

Dès 1892 Weichselbaum avait signalé que la capsule de la bactéridie charbonneuse prend quelquefois une coloration rose ou violette dans les préparations traitées par le bleu de méthylène. M'Fadyean, en 1899, fait connaître tout le parti qu'il serait possible de tirer de la coloration du sang des animaux charbonneux par le bleu de méthylène, mais sans formuler les conditions permettant d'obtenir une réaction caractéristique. Quelque temps plus tard Heim confirme les observations de Weichselbaum et décrit la présence dans les préparations colorées par le bleu de méthylène et entre les bactéridies de granulations amorphes de coloration rosée.

C'est seulement en mars 1903 que M'Fadyean publie son travail classique sur la réaction du sang au bleu de méthylène et confirme ses premières observations. Cette réaction consiste dans la présence de granulations amorphes polychromatiques au voisinage des bactéridies ou irrégulièrement disséminées dans la préparation.

M'Fadyean indique la technique suivante comme la plus favorable : une petite goutte de sang, d'exsudat ou de pulpe d'un parenchyme est déposée sur une lame bien

---

1. FOTH. — Die Milzbrandbazillenfärbung mit Azurfarbstoffen. *Berl. tierärztl. Woch.* 23 février 1911, n° 8, pp. 129-132.

propre, elle ne doit pas recouvrir plus d'un cercle ayant environ 2 millimètres de diamètre. La gouttelette est étalée, avec un fil de platine ou une aiguille aussi uniformément que possible, sur une surface d'environ 10 à 12 millimètres de diamètre. La préparation est desséchée à la température du laboratoire à l'abri de la poussière. La fixation est obtenue après dessiccation en passant la lame trois fois au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, sans trop chauffer. Après refroidissement on colore avec une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 % pendant quelques minutes ; il suffit ensuite de laver à l'eau du robinet, de sécher pour examiner à l'immersion.

On observe à l'examen microscopique les leucocytes, les globules rouges et les bactériidies dont il est possible quelquefois d'apprécier la structure. La particularité de la réaction consiste dans la présence de fines granulations ou d'amas de couleur violette ou rouge pourpre, dont on apprécie mieux la teinte par l'emploi de l'éclairage artificiel.

Quoique l'examen microscopique soit nécessaire pour l'appréciation de la réaction, on peut quelquefois présumer par l'examen direct de la préparation, l'existence ou l'absence des bactériidies. Les lames de sang charbonneux colorées suivant les indications de M'Fadyean, ont une teinte violacée qui les différencie nettement des lames préparées avec le sang d'un animal mort d'une maladie autre que le charbon.

La nature de la matière colorante utilisée à son importance. La réaction est obtenue avec une solution récente, à 1 % de bleu de méthylène de Grübler, à condition de la préparer à l'ébullition et d'ajouter  $\frac{1}{2}$  % de bicarbonate de soude. La solution de bleu de méthylène médicinal pur de Merck donne la réaction.

Même dans les préparations conservées à l'abri de la lumière, la coloration violette des granulations disparaît assez rapidement.

Les granulations violettes plus nombreuses au voisinage

des bacilles, quelquefois même elles entourent le corps d'une ou de plusieurs bactériidies ; d'autre part, les préparations soumises à la réaction de M'Fadyean, décolorées, ne permettant plus la mise en évidence des gaines par la méthode de Olt, sont autant d'arguments qui permettent à M'Fadyean de croire que la substance qui se colore en violet dans la réaction au bleu de méthylène dérive de la gaine de la bactériдие <sup>1</sup>.

La bactériдие charbonneuse se colore par la méthode de Gram, si l'emploi de cette réaction renseigne sur une propriété histo-chimique de la bactériдие, par contre la coloration de Gram masque les détails morphologiques que nous avons signalés.

On ne voit plus que les filaments aux extrémités très légèrement arrondies, exceptionnellement pourtant la coloration peut montrer la constitution de la bactériдие, quelquefois même elle laisse deviner la gaine non teintée ou colorée par l'éosine ou la safranine.

La méthode de Gram constitue, contrairement à l'opinion des auteurs allemands un moyen de diagnostic d'une grande valeur. Dans les produits non souillés, la présence, en grande abondance, de bâtonnets de 5 à 10  $\beta$  de long, « ayant pris le Gram » peut être considérée comme caractéristique de l'infection bactériдienne.

Les caractères morphologiques, cytologiques et histo-chimiques permettront de reconnaître la bactériдие dans les produits provenant des cadavres frais et recueillis purement. Dans ces cas seulement l'identification par l'examen microscopique est possible avec certitude, mais ce problème est beaucoup plus difficile lorsqu'il s'agit de

---

1. PROF. MAC FADYEAN : Une réaction spéciale du sang des animaux morts de charbon. *The Journ. of comparative Path. and Therapeutics*, mars 1903, p. 35. *Anal. in Revue générale méd. vét.* 1903, T. II, p. 430.

PROF. MAC FADYEAN : Nouvelle note relative à la coloration du sang charbonneux avec le bleu de méthylène. *The Journ. of Comparative Path. and Therapeutics*. Déc. 1903, p. 360. *Anal. in Revue générale méd. vét.* T. IV, 1904, p. 183.

Thèse charbon bactériдien.

mettre en évidence la bactériodie dans les produits prélevés un certain temps après la mort, souillés lors de la récolte ou examinés après quelque délai.

Ces difficultés résultent soit de l'existence de bactéries ayant des caractères morphologiques semblables à ceux de la bactériodie, soit de la rareté des bactériodies dans certaines formes de charbon, soit encore des modifications morphologiques de la bactériodie qui surviennent dans les cadavres et qui peuvent même aboutir à la destruction du protoplasma microbien.

### **Présence de formes bactériennes analogues à la bactériodie charbonneuse.**

Le sang et les tissus sont envahis peu de temps après la mort par le vibron septique et des bacilles qui ressemblent à la bactériodie. En dehors de l'infection charbonneuse dans les organes ou dans la viande des animaux sains et des animaux malades on peut trouver des germes suspects. Des formes bacillaires analogues à la bactériodie charbonneuse sont trouvées dans l'eau, dans le sol ; elles peuvent souiller les produits à examiner et exposer à l'erreur les bactériologistes qui tenteraient l'identification d'après les caractères microscopiques.

Le vibron septique peut être caractérisé dans le sang frais par ses dimensions, surtout par sa mobilité. Dans les préparations colorées le vibron est plus grêle que la bactériodie, il est constitué de théories d'éléments en nombre variable pour constituer quelquefois de longs filaments ; ses extrémités sont arrondies, on ne note jamais la forme en canne de bambou, fréquente dans les préparations faites avec la bactériodie. Le vibron septique se colore par le Gram.

*Bacillus subtilis*, très répandu dans le milieu extérieur et plus particulièrement dans les fourrages, est très voisin morphologiquement de la bactériodie.

### Bacilles Anthracoides.

A côté de ces espèces bien étudiées et bien différenciées on rassemble dans un groupe hétérogène un grand nombre de bactéries qui ont quelque analogie avec la bactériodie charbonneuse. On les désigne sous le nom de bacilles anthracoides ou de bacilles pseudo-charbonneux. Leur existence complique singulièrement, lorsqu'elle ne la rend pas impossible, la recherche micrographique de la bactériodie charbonneuse.

Nous signalerons, pour montrer l'ubiquité et la multiplicité des bacilles pseudo-charbonneux, quelques types bien décrits.

Hüppe et Wood ont isolé de la terre et de l'eau *Bacillus anthracoides* qui ressemble par sa forme et ses caractères de culture à la bactériodie charbonneuse ; ce microbe a été retrouvé dans la peau d'un cheval et dans les poussières (Hoppe). Burri décrit un *Bacillus pseudanthracis* dans des farines sud-américaines. Klein a étudié le *Bacillus sessilis* isolé du sang d'une vache suspecte de charbon. Cette longue nomenclature comprendrait encore *Bacillus pseudanthracis* (Kaesewurm), *Bac. anthracis simulans* (Wahrlich), *Bac. anthracis similis* (M'Farland), *Bac. apicum* (Canestrini), *Bac. leptosporus* (Klein), *Bac. mycoïdes* et *pseudo-mycoïdes*...

D'autres microbes anthracoides ont été isolés de l'eau, de la laine (Gottstein), du lait de chèvre (Schulz), du sang (Willach), des fèces du bœuf, (Hoppe)...<sup>1</sup>

---

1. On trouvera des indications nouvelles et une bibliographie à peu près complète de la question dans la thèse de st. HOPPE. Verbreitung Milzbrandähnlicher Bazillen in den Aussenwelt. 46 p. Berlin. Heinicke N. W. 7, 36 Dorotheenstr. 36.

Consulter également :

ERNST BAUMANN. — Ueber den Befund von milzbrandähnlichen Bazillen in Wasser. *Hyg. Rundschau*. T. XV. 1<sup>er</sup> Janvier 1905, p. 7.

R. E. MONTGOMERY. — An anthrax-like Bacillus found in a horse suspected of anthrax. *Journ. of trop. veterinary Science*, T. I, n° 3 Juillet 1906, pp. 284-294.

Des constatations de Hoppe qui trouve un bacille pseudo-charbonneux dans les matières excrémentielles du bœuf, il faut rapprocher l'opinion émise par Arndt sur la présence possible de la bactériidie charbonneuse dans l'intestin des animaux sains. La connaissance des porteurs de germes de diverses infections, la présence notamment des bacilles du rouget dans les amygdales et l'intestin des porcs non atteints de la maladie, sont des arguments en faveur de la présence de la bactériidie charbonneuse chez des animaux sains ou morts d'une maladie autre que le charbon. Une hypothèse aussi vraisemblable vient compliquer encore la recherche de la bactériidie et rend impossible l'interprétation des résultats.

Si les bactériidies pullulent dans le sang et dans tous les parenchymes des animaux ayant succombé au charbon, on sait qu'elles n'apparaissent dans le sang des malades que dans les 12 ou 14 heures qui précèdent la mort. Il en résulte que dans les formes apoplectiques du charbon, cette multiplication agonique n'a pas le temps de se produire et que les bactériidies sont extrêmement rares dans le sang et les organes, elles peuvent même manquer dans les quantités, toujours extrêmement faibles, de sang qui sont soumises à l'examen microscopique. La rareté ou l'absence des bactériidies dans les préparations obtenues avec des produits frais alors que les autres procédés du diagnostic ont permis d'assurer le diagnostic, a été souvent signalée (Bongert, Paul, Siabenrogg, Foth...)

Les bactériidies sont difficiles à découvrir par l'examen microscopique dans les organes des porcs charbonneux (Ostertag, Friedberger et Fröhner,...)

Dès que les produits suspects renferment d'autres germes, les caractères morphologiques de la bactériidie ne suffisent plus pour l'identifier avec certitude, d'autant plus que sous l'influence de la putréfaction, il se produit des modifications qui empêchent de formuler un diagnostic. La gaine qui enveloppe la bactériidie existe chez plusieurs

bacilles pseudo-charbonneux, ce qui enlève à cette particularité presque toute valeur diagnostique.

Sous l'influence de la putréfaction des produits pathologiques, surtout lorsque les cadavres ont été éviscérés longtemps après la mort, la bactériodie subit rapidement des altérations, il se produit une lyse de la substance chromatique et en moins de vingt-quatre heures, lorsque la température est élevée, le contenu de la bactériodie ne prend plus la matière colorante. Mais la gaine résiste mieux au processus de destruction et on peut trouver dans les préparations des *capsules vides*, ou ne renfermant que des bactériodies réduites à un filament très grêle formé de quelques granulations.

En ce qui concerne la recherche de la bactériodie lors des autopsies tardives, les éléments spécifiques et bien caractérisés ont disparu vingt-quatre heures après la mort ; avec les méthodes de coloration spéciales aux capsules, de Klett ou de Olt, on peut encore trouver 2 ou 3 jours après la mort des bactériodies encapsulées ou des capsules vides<sup>1</sup>. Au-delà de ce délai le diagnostic par le seul examen microscopique devient incertain et insuffisant, bien que parmi les bactériodies toutes ne soient pas détruites, quelques-unes sont capables de persister — morphologiquement — huit ou dix jours dans les cadavres, (Buch) et même jusqu'au treizième jour après la mort (Berndt).

La réaction du sang au bleu de méthylène préconisée par M'Fadyean permet non seulement de caractériser la bactériodie dans les produits frais, mais elle peut être utilisée pour le diagnostic du charbon dans le sang putréfié, recueilli tardivement après la mort ou examiné après quelque délai. La spécificité de la réaction de M'Fadyean a été confirmée par Schaffer<sup>2</sup>, le sang des animaux ayant succombé au rouget, au choléra des poules, à la morve,

---

1. CARL SCHIP. — Milzbrand und Milzbranddiagnostik.

2. SCHAFFER. — La coloration de la bactériodie d'après Mac Fadyean. *Zeitsch. f. Fleisch und Milchhygiene*, mars 1904. Sign. in *Revue Générale Med. Vet.*, T. III, 1904, p. 330.

ne donne pas avec le bleu de méthylène les granulations violacées caractéristiques de la présence de la bactérie charbonneuse.

Pourtant la réaction peut manquer soit en raison d'une fixation défectueuse, d'un colorant non approprié.

Mitter <sup>1</sup> de Calcutta, ayant échoué dans ses essais pour caractériser la bactérie par la méthode de coloration de M'Fadyean, avait cru pouvoir attribuer cet échec à une particularité qui ferait que les propriétés tinctoriales de la bactérie ne seraient pas les mêmes dans l'Inde qu'en Europe. Holmes <sup>2</sup> a fait justice de cette opinion ; opérant dans le même milieu que Mitter mais suivant fidèlement les indications de M'Fadyean, il n'a pas observé de différence dans la manière de se comporter des bactéries, qu'elles soient isolées dans l'Inde ou qu'elles proviennent d'Europe.

La coloration particulière par le bleu de méthylène ne peut être obtenue que dans les produits qui contiennent ou qui ont contenu des bactéries. Elle fait défaut avec le sang de porc (M'Fadyean) mais par contre elle peut être obtenue facilement avec la pulpe des ganglions de la région pharyngienne.

La réaction de M'Fadyean persiste dans le sang quarante huit heures après la mort (Schaffer) et même quarante-huit à quatre-vingt-seize heures d'après Stockman <sup>3</sup>. Les observations recueillies par cet expérimentateur montrent bien que, 48 heures après la mort, l'appréciation devient difficile. Stockman note, en effet, pour un cobaye que la réaction est bien marquée au moment de la mort

---

1. MITTER. — Observations on some staining peculiarities of Anthrax Bacilli. *Journ. of Trop. Vet. Science*, n° 1, 1909, p. 68.

2. J. D. E. HOLMES. A note on the M'Fadyean staining reaction for Anthrax bacilli. *Agricultural Research Institute, Pusa, Bulletin* n° 36, p. 1913.

3. Sir STOCKMAN. Anthrax. Extrait from the *Report of the Board of Agriculture and Fisheries 1905*, Publié in *Journal of Trop. Veterinary Science* Vol. I, n° 6 — Octobre 1906.

et même vingt heures plus tard. A la quarante-septième heure, la réaction est moins marquée, quoique encore très distincte ; 67 heures après la mort la réaction est encore assez marquée pour être utilisée pour le diagnostic ; elle est légère à la quatre-vingt-huitième heure; elle faisait défaut le cinquième jour (128 heures).

La coloration au bleu de méthylène, suivant les indications de M'Fadyean, peut être utilisée concuremment avec les autres méthodes spéciales à la bactériidie, mais elle ne saurait les supplanter. La mise en évidence de la bactériidie par sa gaine d'enveloppe et ses formes dégénérées, donne des indications pendant un délai beaucoup plus long après la mort, que la réaction de M'Fadyean.

Quant à la spécificité de la réaction elle est contestable.

L'origine des granulations métachromatiques de la bactériidie suffit à établir que tous les microbes encapsulés peuvent montrer cette particularité. Ni la présence d'une gaine, ni la réaction signalée par M'Fadyean ne sont des caractères spécifiques de la bactériidie charbonneuse, la constatation de l'un de ces signes est insuffisante pour assurer le diagnostic. Ces particularités sont pourtant d'une grande valeur lorsque des présomptions d'un autre ordre ont été recueillies sur la nature de la maladie (mort rapide, tuméfaction de la rate, altération du sang, présence de nombreux bâtonnets,... coloration par le Gram.)

## B

### INOCULATION EXPÉRIMENTALE.

Il suffit de rappeler que les bactériidies peuvent ne pas être conservées dans le sang des animaux morts de charbon, soit parce qu'elles sont rares ou qu'elles ont été détruites pour démontrer l'impossibilité, dans la plupart des

cas, d'assurer le diagnostic du charbon « bactérien par le seul examen microscopique. Il est nécessaire de compléter, de préciser les indications recueillies et de chercher d'autres éléments d'identification pour la mise en évidence des aptitudes pathogènes et des propriétés biologiques des bactéries rencontrées ou dont on suspecte la présence : les inoculations et les cultures permettent de répondre à ces indications <sup>1</sup>.

L'inoculation des produits suspects est pratiquée sous la peau de la souris, du cobaye, du lapin, du mouton qui se montrent également sensibles ; les expérimentateurs utilisent de préférence le cobaye ou la souris.

L'inoculation sous-cutanée détermine de l'œdème vers la dixième ou la quinzième heure ; la mort survient entre 36 et 40 heures chez le cobaye et la souris, en 48 ou 60 heures chez le lapin. Les souris peuvent succomber tardivement à l'inoculation virulente au quatrième ou cinquième jour, quelquefois après une semaine (Fischœder). L'examen de la sérosité recueillie au point d'inoculation dans les heures (deuxième ou quatrième) qui suivent la pénétration des produits virulents, peut fournir des indications utiles pour le diagnostic.

A l'autopsie des animaux ayant succombé à l'inoculation sous-cutanée on constate un œdème gélatineux, tremblotant, à peine rosé, renfermant peu de microbes et peu de leucocytes. La rate est volumineuse, friable et molle. La vessie renferme constamment chez le cobaye, de l'urine

---

1. Ces notions classiques ont été commentées par V. GALTIER. Rôle de l'examen bactériologique dans le diagnostic du charbon bactérien. Incertitude de ses données dans quelques cas et nécessité de recourir à un procédé de contrôle. *Journ. Méd. Vét. et Zootechnie*, 31 Janvier 1904, p. 16.

Consulter également les observations suivantes :

GUÉRIN. — Au sujet du diagnostic du charbon bactérien dans les viandes foraines. *Bull. Soc. Centr. Méd. Vét. T. LXXXII*, n° 9, 30 Avril 1905, pp. 213-218. Sign. in *Revue générale méd. vét. T. V*, 1905, p. 574.

MOULÉ. — Diagnostic du charbon bactérien dans les viandes foraines. *Bull. Soc. Centr. Méd. Vét. T. LXXXII*, n° 10, 30 Mai 1905. Sign. In *Revue générale Méd. Vét., T. V*, 1905, p. 685.

sanguinolente. Le sang est noir, mal coagulé, poisseux, ne rougit plus à l'air.

Les renseignements fournis par la durée de l'évolution, par les signes constatés à l'autopsie, devront toujours être complétés pour assurer le diagnostic de l'examen microscopique du sang et de la pulpe du foie ou de la rate. Les bactériidies doivent toujours être recherchées dans l'œdème du point d'inoculation où elles existent, alors qu'elles peuvent faire défaut dans le sang et les organes.

Si l'inoculation des produits frais permet facilement d'interpréter les indications fournies par l'examen microscopique, la méthode est moins souvent utilisable et les résultats plus difficiles à interpréter lorsqu'il s'agit de produits recueillis plus de vingt-quatre heures après la mort.

Déjà Pasteur avait fait cette observation que si le bacille charbonneux est inoculé avec d'autres microbes par eux-mêmes inoffensifs, le charbon ne se développe pas et les animaux restent bien portants. De nombreuses recherches ont bien établi depuis l'influence empêchante du streptocoque de l'érysipèle (Emmerich), du cocco-bacillus prodigiosus, du pneumobacille de Friedländer, du bacille pyocyanique (Pawlovsky, Watson-Cheyne, Bouchard) du staphylocoque (Czaplewski, Frank, Beco, Bergonzini...), du bacillus coli et du bacillus enteritidis Gärtner (Gill-ruth). Les animaux peuvent ne pas résister à l'inoculation des produits souillés, mais succomber à une infection dont l'évolution entrave ou masque le développement de la bactériodie charbonneuse. Le vibron septique passe rapidement de l'intestin dans le sang des animaux qui succombent au charbon ; pour éviter l'apparition de la septicémie gangréneuse chez les animaux réactifs (cobaye ou souris) on aura recours à l'inoculation par scarification : le dépôt du sang suspect à la surface de la peau rasée et scarifiée, ou sur une plaie notamment après excision d'un lambeau d'oreille, suffit pour créer l'infection charbonneuse, ce mode d'inoculation ne se prête pas au développement

de la septicémie. Chez le lapin, les produits impurs seront inoculés dans les veines. On pourrait utiliser l'inoculation sous-cutanée chez des animaux immunisés contre le vibron septique par le sérum spécifique.

Si la méthode de l'inoculation cutanée met à l'abri des complications gangréneuses, par contre elle ne donne pas toujours des résultats satisfaisants, les bacilles rares ou modifiés dans les produits suspects, ne pénètrent qu'en trop petite quantité dans les capillaires de la peau pour créer l'infection.

L'inoculation, en apparence plus sûre dans ses résultats que l'examen microscopique, ne suffit pas pour établir ou pour éliminer le diagnostic du charbon. Comme le dit avec raison C. Fränkel ; « l'inoculation ne doit être négligée en aucun cas, mais il ne faut pas la considérer comme une méthode de démonstration décisive. Elle est moins sûre que la simple culture dans les milieux artificiels. »

## C

### CULTURE DANS LES MILIEUX ARTIFICIELS.

La bactériidie est caractérisée dans les cultures à la surface de la gélose ou de la gélatine, par le développement de colonies blanches, crémeuses, émettant des prolongements ondulés que l'on a comparés à des boucles de cheveux ; dans la profondeur de la gélatine on observe des taches grisâtres d'aspect mycoïde. Les colonies caractéristiques ou suspectes doivent être isolées pour étudier la morphologie et l'action pathogène des microbes qui les constituent.

L'isolement de la bactériidie dans les produits suspects est fait à la surface de la gélose ou de la gélatine. La culture en plaques présente l'avantage de permettre la dilution comme les autres méthodes et de fournir une grande surface pour le développement des colonies ; les boîtes de

Roux peuvent être examinées au microscope. Quand les produits sont très riches en formes bactériennes diverses et renferment peu de bactériidies, la dilution ne devra pas être faite, dans trois tubes seulement, mais dans cinq ou six <sup>1</sup>.

Bien que la culture soit le procédé le plus rigoureux pour déceler sa bactériidie, il ne peut pas être employé seul à l'exclusion des autres procédés du diagnostic expérimental. Beaucoup parmi les bacilles anthracoides se développent avec des caractères analogues à ceux de la bactériidie <sup>2</sup> ; la différenciation peut être tentée par l'examen des colonies profondes qui présentent l'aspect de colonies charbonneuses ; par la culture dans le bouillon, mais elle ne peut être assurée que par l'examen microscopique et l'inoculation <sup>3</sup>.

L'insuffisance, les difficultés et les incertitudes du diagnostic expérimental montrent qu'il est nécessaire, pour obtenir une certitude, de recourir en même temps à l'examen direct, à la culture et à l'inoculation. Mais si la bactériidie est facile à déceler et à identifier dans les produits

---

1. J. BONGERT. Beiträge zur Biologie des Milzbrandbazillus und sein Nachweis im Kadaver der grossen Haustiere. *Centralbl. für Bakt. I. Originale* T. XXXIV et XXXV, sept-nov. 1903 anql. in *Revue générale méd. vét.*, T. IV, 1904, p. 661.

2. P. KAESTNER. — Zum Nachweis des Milzbrandes durch Züchtung. *Zeitsch. f. Fleisch. und Milchhyg* 1904, n° 5.

FISCHÖDER. — Même sujet. — *Fortschritte der Veterinär Hygiene*. Heft. 10 Janvier 1906.

P. KAESTNER. — Bemerkungen zu dem Artikel Fischöders « zum Nachweis des Milzbrandes durch Züchtung. »

*Zeitsch. Infektionskrankh. der Haustiere*, Bd I. 1906, pp. 216-219. Sign. in *Revue Générale Méd. vét.*, t. VII, 1906, p. 511.

FISCHÖDER. — Erwiderung auf Kaestners Bemerkungen zu dem Aufsatz zum Nachweis des Milzbrandes durch Züchtung. *Fortschr. der veterinär Hygiene*, Mai 1906.

3. KAESEWURM. — Sur le diagnostic bactériologique du charbon par le procédé des plaques, principalement au point de vue de la différenciation du bacille pseudo-charbonneux. *Zeitsch. f. Fleisch. und Milchhyg.* fev. 1904. Sign. in *Revue générale méd. vét.*, t. III, 1904, p. 214.

frais, cette recherche devient difficile lorsque les produits ont été prélevés tardivement après la mort, recueillis ou conservés dans de mauvaises conditions. Aussi est-il indispensable de s'inspirer de certaines règles ou de recourir à des méthodes particulières pour *la récolte, la conservation et l'envoi de produits suspects*.

## D

### CONDITIONS DE LA RÉCOLTE, DE LA CONSERVATION ET DE L'ENVOI DES PRODUITS SUSPECTS.

Les prélèvements doivent être pratiqués aussi rapidement que possible après la mort. Sur les animaux qui viennent de succomber, le sang recueilli dans le cœur ou dans une veine, la pulpe de la rate, conviennent pour les recherches ultérieures. Lorsque les cadavres sont ouverts plus de vingt-quatre heures après la mort le sang sera recueilli dans la jugulaire ou dans une veine de l'oreille, le liquide spumeux et sanguinolent qui souille les cavités nasales convient également pour la recherche. On peut encore exciser l'oreille aux trois quarts de la longueur à compter de sa pointe (Frey) <sup>1</sup>, ou un fragment de la queue pour l'adresser à un laboratoire ; la pièce est enveloppée dans une bande de gaze imprégnée de sublimé à 1 p. 1.000 <sup>2</sup>.

La présence des spores charbonneuses sur la peau, les poils, la laine des animaux morts de charbon a donné l'idée de recourir à l'examen de la peau et des poils pour assurer le diagnostic. On prélève à l'autopsie un lambeau de peau que l'on fixe sur une planchette jusqu'à dessic-

---

1. FREY. — Problemes in anthrax control. *Journal of the American veterinary medical Association*, Mai 1919.

2. G. HART. — Instructions for preparing and shipping pathological specimens for diagnosis. 33<sup>rd</sup> *Report of the Bureau of Animal Industry*. Circular 123.

cation. La recherche de la bactéridie, dans les fragments de peau desséchée, peut être faite très longtemps après la mort, même 14 mois, sur des cadavres laissés à l'air ou enfouis. Au laboratoire il suffit de racler la peau avec un scalpel, de triturer le produit de raclage avec de l'eau stérile et d'ensemencer en tubes de bouillon par doses de 1 à 5 gouttes. Les tubes sont chauffés à 65-70 degrés pendant 30 minutes pour détruire les germes non sporulés. Après chauffage, leur contenu est réparti sur de la gélose pour isoler et identifier les colonies de la bactéridie (A. Ciuca et G. Stoicesco) <sup>1</sup>.

L'examen des matières excrémentitielles présenterait pour des raisons identiques, les mêmes avantages que l'examen de la peau. Chez les animaux qui succombent au charbon, les bactéridies trouvent dans l'intestin des conditions favorables à la sporulation et dans les cultures, les colonies charbonneuses sont d'autant plus nombreuses qu'on examine plus tard les fèces. « L'examen bactériologique des fèces serait un moyen sûr de diagnostic post-mortem, même quand les cadavres sont putréfiés. » (Cierca et Fenea) <sup>1</sup>.

En raison de la rapidité avec laquelle les bactéridies sont détruites dans le sang et les parenchymes même après leur prélèvement hâtif et aseptique, on doit profiter, pour l'envoi, de la résistance de ces mêmes agents à la dessiccation. Les recherches primitives de Momont ont établi que les bactéridies survivent 45 à 60 jours dans le sang desséché, ces résultats ont été maintes fois confirmés <sup>3</sup>.

---

1. AL. CIUCA ET G. STOICESCO. — Diagnostic bactériologique du charbon par les cultures de la peau. *Archiva veter.* Mars-Avril 1909, pp. 71-85 et *Réunion biologique de Bucarest in C. R. Soc. Biol. T. LXVII, 1909, p. 140.*

2. A. CIERCA ET G. FENEA. Recherches sur le diagnostic post-mortem du charbon bactéridien par l'examen bactériologique des matières fécales. *Réunion biologique Bucarest in C. R. Soc. Biol. T. LXVII 1909, p. 301.*

3. KAESEWURM. — Recherches sur le temps pendant lequel la bac-

Le sang ou la pulpe de la rate seront étendus sur une lame porte objet, puis desséchés rapidement (Kitt, Bongert). On peut se contenter de déposer quelques gouttes de sang sur une lame de verre, sur une feuille de papier (Kaestner) ou encore imprégner des fils de soie (Heim, G. Mazzini) <sup>1</sup> un tampon de laine ou d'ouate, un petit morceau de gaze (Frey) avec les produits virulents ; dans tous les cas la dessiccation doit être rapide. L'examen peut être tenté par la recherche directe de la bactériémie dans le produit desséché mis en suspension dans l'eau physiologique ; la culture est indispensable pour assurer le diagnostic, l'isolement est fait, après ensemencement sur la gélose maintenue liquide à 42 degrés, dans des boîtes de Roux.

Il est encore possible de mettre dans un tube stérile, quelques gouttes de sang ou de parenchyme suspect.

Le liquide ne doit pas occuper plus de deux ou trois millimètres de hauteur, dans le tube bouché avec un léger tampon de coton cardé, la dessiccation est rapidement obtenue (Fischœder) <sup>2</sup>.

D'autres procédés réalisent la conservation de la virulence des produits à examiner en fournissant aux microbes les conditions nécessaires à leur sporulation. Olt a recommandé l'envoi du sang charbonneux entre les deux moitiés d'une pomme de terre préalablement lavée, puis cuite.

Mais c'est surtout le procédé strasbourgeois étudié par Forster, puis par Jakobsthal, Pfersdorff, Marxer... qui avait paru convenir le mieux pour l'envoi et la conservation des produits suspects.

Le sang doit être prélevé dans les veines superficielles

---

tériémie peut être trouvée dans les cadavres et sur l'épreuve des produits virulents secs par la culture et la coloration. *Zeitsch. f. Fleisch. and Milchhygiene*, mars 1904. Anal. in *Revue Générale Méd. Vét.*, T. V, 1905, p. 209.

1. G. MAZZINI. Contributo sperimentale alla diagnosi del carbonchio ematico. *R. Società ed Accad. Vet. Ital.* 13 Juillet 1907.

2. FISCHÖDER. Die Milzbranddiagnose. *Fortschritte der veterinär Hygiene*, Avril-Mai, Juin 1903, pp. I, 64 et 106. Anal. in *Revue générale Méd. Vét.* T. III, 1904, p. 191.

(jugulaire) ou encore sur des coupes fraîches pratiquées dans la rate ou dans les caillots fibrineux du cœur. Le matériel suspect est étalé sur une petite baguette de plâtre, en couche mince, de telle sorte que la coloration de la surface imprégnée ait une teinte peu foncée.

Les baguettes de plâtre utilisées, qui se trouvent dans le commerce, ont été imprégnées de bouillon par immersion. Dans les tubes où elles sont introduites, les baguettes de plâtre reposent sur un petit tampon d'ouate hydrophile qui maintient l'humidité du milieu. Les tubes sont bouchés avec un tampon de coton cardé, celui-ci doit pénétrer assez profondément pour immobiliser la baguette et éviter qu'elle ne se brise pendant le transport.

Dans ce milieu et sur ce substratum les bactéridies trouvent les conditions de nutrition, d'aération et d'humidité nécessaires à leur sporulation. Au laboratoire une partie du matériel est utilisée pour la recherche microscopique, la partie de la baguette, recouverte de sang, est raclée et broyée dans un tube de bouillon ; après ce prélèvement la baguette est reportée aseptiquement dans le tube et maintenue à 18-22°.

Le tube de bouillonensemencé est chauffé 2 minutes à 65 degrés pour détruire les microbes autres que la bactéridie (proteus, coli...) puis rapidement refroidi. La dilution sert à ensemercer, avec une seule prise de liquide, trois tubes de gélose pour l'isolement. Les colonies obtenues sont identifiées par l'examen direct et après coloration, la culture en bouillon, l'inoculation.

Si ces premières recherches ne permettent pas de trouver la bactéridie charbonneuse, on reprend la baguette, maintenue à 18-22 degrés pendant 2 ou 3 jours. On racle et on dilue la surface imprégnée de sang dans un tube de bouillon, que l'on chauffe dix minutes à 65 degrés ; ultérieurement les opérations sont les mêmes que lors du premier examen <sup>1</sup>.

---

1. J. FORSTER. — Sur un moyen de recherche de la bactéridie char-

Le procédé strasbourgeois a donné d'excellents résultats. En Alsace-Lorraine il était adressé au laboratoire, en même temps que la baguette de plâtre, trois préparations faites avec la rate ou le sang, on pouvait constater que dans 32 % des cas où l'examen microscopique étant négatif ou douteux, les recherches sur le bâtonnet de plâtre donnaient un résultat positif.

L'inconvénient de ce procédé est qu'il exige la baguette de plâtre préparée et stérilisée à l'avance, aussi a-t-on proposé diverses modifications à la méthode pour la rendre d'une application plus pratique ; d'autre part le bâtonnet de plâtre est très fragile et lorsqu'il arrive en morceaux au laboratoire, les opérations sont plus laborieuses. Olt a préconisé l'emploi d'un bâton de craie, Eberle pense que l'on peut substituer au plâtre un petit morceau de carton ou toute autre substance poreuse, Schüller <sup>1</sup> préfère de petits rouleaux de papier filtre. Grabert confirme l'opinion de Schüller tandis que Foth et Wulff démontrent que le papier filtre ne convient pas aussi bien que le plâtre. Schüller avait constaté, et le fait est confirmé par la suite à l'Institut d'Hygiène de Strasbourg, que la

---

bonneuse dans le sang et les tissus. *Centralblatt für Bakteriologie, Originale* Bd X L Heft 5 10 Mars 1906, pp. 751-753. *Anal. in Revue générale méd. vét., T. VIII, 1906, pp. 438-440.*

MARXER. — Recherches pratiques sur une nouvelle méthode pour le contrôle du diagnostic de la fièvre charbonneuse. *Zeitsch. f. Fleisch und Milchhyg.* fev. 1905. *Sign. in Revue générale Méd. Vét., T., V. 1905. p. 228.*

JACOBSTHAL ET PFERSDORFF. — Grundlagen einer biologischen Methode zum Nachweis des Milzbrandes in der Praxis (Strassburger Gipsstäbchen methode) *Zeitsch. f. Infektionskrankheiten der Haustiere, 1906, Bd. I, pp. 102-123.*

DAUSEL. — Sur le diagnostic du charbon. *Zeitsch. f. Fleisch und Milchhygiene.* Avril 1906. *Sign. in Revue générale Méd. Vét., T. VII, 1906, p. 448.*

DE BLIECK. — Miltvuur. Diagnostiek in de practijk. *Tijdsch. Voor Veeartsenisk.* Deel 34. Afl. 3. 1906, pp. 109-151.

1. R. SCHÜLLER. — Beitrag zum bakteriologischen Milzbrandnachweis. *Zeitsch. f. Infektions Krank. der Haustiere, Bd V, pp. 1-43.*

baguette de plâtre imprégnée de bouillon, utilisée tardivement ne convient pas toujours pour la sporulation et qu'il est préférable de la plonger dans de l'eau au moment de l'emploi.

Engler <sup>1</sup> puis Müller et Engler <sup>2</sup> se sont inspirés des critiques faites à la méthode pour entreprendre sous la direction de Forster, de nouvelles recherches afin de rendre la méthode plus pratique et plus sûre. Ils ont étudié comparativement le carton, le bois de sureau ou de cèdre, le papier filtre, la terre cuite, la brique proposée par Reinecke <sup>3</sup>, la craie, le plâtre. Les substances qui conviennent le mieux sont la craie et la terre cuite. Les auteurs ont formulé de nouvelles indications qui font du procédé imaginé par Forster un procédé plus certain, plus simple et plus pratique.

On stérilise par la chaleur ou par l'ébullition un petit fragment d'un pot à fleurs, on le refroidit dans l'eau du robinet, fraîche et bien aérée, on laisse égoutter. La face rugueuse est recouverte d'une épaisse couche de sang dans laquelle on recherchera les bactériidies ; sur la face lisse

---

1. A. ENGLER. — Experimentelle Untersuchungen hinsichtlich der für die Bewirkung der Sporulation des Milzbrandbazillus geeigneten Substrate vermittelt des « Strassburger Verfahrens » zum Nachweis von Milzbrand. *Vet. Med. Dissertation* Bern 1910.

2. M. MÜLLER et A. ENGLER. Über die Erhöhung der Leistungsfähigkeit des Strassburger Verfahrens zum Nachweis von Milzbrand. *Zeitsch. f. Infektions Krankheiten der Haustiere*, Bd VIII Heft, 4-5. 6 Octobre 1910, pp. 346-353.

3. REINECKE. — L'état actuel du diagnostic du charbon. *Zeitsch. f. Veterinärkunde*, Mai 1905 p. 193. *Anal. in Revue générale Méd. Vét. T. VII*, 1906, p. 313.

CARL. — Diagnostic du charbon. *Deutsche tierärztl. Woch.* 16 Juillet 1904. *Sign. in Revue Générale Méd. Vét. T. IV*, p. 141.

ERNST. — Nouvelles améliorations à la diagnose microscopique de la fièvre charbonneuse. *Monatshefte f. Tierheilkunde* 18 Nov. 1905 liv. 3 et 4 — *Sign. in Revue générale méd. vét. T. VI* — 1905 p. 729.

H. GRABERT. — Ein weiterer Beitrag zum bakteriologischen Milzbrandnachweis. *Zeitsch. f. Infektions Krankh. der Haustiere*. Bd. VII pp. 239-255.

les produits à examiner seront étalés en couche mince pour réaliser une sporulation aussi rapide que possible. Le petit morceau de terre cuite est adressé au laboratoire dans une boîte. Les opérations ultérieures se poursuivent suivant les indications données tout d'abord par Jakobsthal et Pfersdorff.

S'inspirant du parti qu'il est possible de tirer des substances poreuses, Bozzelli <sup>1</sup> a eu l'idée d'utiliser, pour la conservation du matériel charbonneux, les tiges de *Ferula communis*, ombellifère très répandue dans les plaines de l'Italie méridionale et que l'on rencontre dans tous les pays tempérés. Les fibres de la tige de la fêrûle sont très poreuses et, après dessiccation, absorbent facilement les liquides, propriété importante pour la conservation des produits charbonneux. D'autre part, les fibres internes de la plante ne contiennent aucun microorganisme ni aucune substance capable de nuire aux germes charbonneux.

La préparation des tiges est des plus simples. On choisit une tige de fêrûle bien sèche que l'on divise en fragments par des sections nettes pratiquées entre deux nœuds. Chaque fragment est partagé en deux par une section longitudinale, et on enduit une des surfaces de section avec le produit suspect. Lorsque celui-ci a été presque entièrement absorbé, on le recouvre avec l'autre moitié de la tige et on maintient le tout à l'aide d'une ligature.

Les expériences réalisées par l'auteur pour contrôler la valeur de ce procédé ont montré que du matériel charbonneux prélevé sur des cobayes inoculés expérimentalement et recueilli jusqu'à dix heures après la mort, est capable d'infecter le cobaye après quinze jours de conservation à la température ambiante. Après le quinzième jour, on peut encore isoler des colonies de bactériidies charbonneuses sur plaque de gélose. Dans le même délai, on peut mettre en évidence la forme végétative de *Bacillus*

---

1. R. BOZZELLI. — Sur la conservation du matériel charbonneux dans les fibres des tiges de fêrûle (*Ferula communis*). *Il moderno Zooiatro*, 30 Septembre 1902, p. 382.

*anthracis* dans le matériel conservé. Les capsules restent visibles jusqu'au huitième-dixième jour et on peut trouver des résidus des capsules jusqu'au quatorzième-seizième jour. Les spores ne se forment généralement que vers le douzième-quinzième jour, mais on peut cependant les voir apparaître au bout de trente-six heures si l'oxygène arrive au contact du produit conservé. La virulence du matériel charbonneux n'est nullement modifiée au bout de quinze jours de conservation.

Ce procédé de conservation pourrait être appliqué à d'autres produits pathologiques. Il est probable que d'autres tiges desséchées pourraient être utilisées, comme les tiges de fêrûle, pour la conservation et l'expédition de ces produits.

Pendant un temps le procédé strasbourgeois <sup>1</sup> sous ses diverses modalités a joui d'une certaine faveur. A la vérité son emploi ne s'est jamais généralisé. L'usage des matériaux poreux les plus divers et les plus simples, destiné à remédier aux difficultés rencontrées pour se procurer au moment voulu les baguettes de plâtre, n'a fait que pallier aux inconvénients du procédé.

Au surplus l'utilisation des matériaux parvenus au laboratoire n'est pas toujours commode ; de ce fait, les résultats perdent beaucoup de leur précision.

Le procédé strasbourgeois n'ayant résolu que provisoirement et imparfaitement la question du prélèvement de l'envoi des produits destinés au diagnostic du charbon bactérien, le problème restait entier. Nous en rappelons sommairement les données essentielles : Il s'agit d'un prélèvement qui doit être effectué simplement pour éviter la contamination du milieu et de l'opérateur, qui peut l'être tardivement après la mort (autopsie retardée, contreverse, expertise, enfouissement préalable,...) ; les produits doivent se conserver pendant le transport et au laboratoire leur manipulation doit être simple pour assu-

---

1. Cf. Précis de microbiologie des maladies infectieuses des animaux de J. COURMONT et L. PANISSET.

rer la sécurité et la célérité de leur examen. Le procédé de Wulff<sup>1</sup>, paraît devoir répondre à ces indications multiples, il apporte une solution définitive, pour le moins de grande valeur, à un problème posé depuis si longtemps. Le procédé consiste essentiellement à mettre à profit la propriété que possède la bactériodie charbonneuse de se conserver dans la moelle osseuse des animaux qui ont succombé à la fièvre charbonneuse. Wulff s'est convaincu par quelques essais préalables que si la bactériodie disparaît rapidement, après quelques jours, du sang et des organes des animaux morts de charbon, elle persiste longtemps, jusqu'à 24 jours, dans la moelle osseuse même lorsque les cadavres ou les os ont été enfouis ; les procédés les plus simples de l'analyse bactériologique, examen et cultures, permettent de mettre la bactériodie en évidence.

Wulff conseille l'envoi du métacarpien ou du métatarsien, les os longs sont plus propres que les os spongieux à la conservation et partant à la recherche de la bactériodie charbonneuse.

Les premières constatations de Wulff ont été confirmées par Grabert<sup>2</sup>, par Marchiosotti<sup>3</sup>, puis par Sani. Tous les expérimentateurs sont d'accord pour reconnaître que le procédé de Wulff doit être adopté de préférence à tout autre pour le diagnostic du charbon bactériodien et que la putréfaction même avancée du cadavre n'est pas de nature à faire rejeter son emploi.

Le procédé de Wulff est sorti rapidement de la phase expérimentale. Depuis plusieurs années nombre de labo-

---

1. WULFF. Diagnostic du charbon par l'examen de la moelle. *Berliner tierärztliche Wochenschrift*. 13 Juin 1912.

2. GRABERT. — Détermination de la présence des germes du charbon bactériodien dans la moelle des os. *Zeitschrift für Infektions Krankheiten.. der Haustiere*, T. 16, Fasc. 5, 25 Mai 1915, p. 324.

3. A. C. MARCHIOSOTTI. Diagnostico della fiebre carbunclosa. Recoleccion de materiales. *Revista de la Facultad de agronomia y veterinaria de la Plata*. T. XII, n° 1, 1915. Contribution al diagnostico della fiebre carbunclosa. *Resista de la Facultad de agronomia y veterinaria de la Plata*. T. XII, 1917.

ratoires recommandent d'expédier un os long — métacarpien ou métatarsien — lorsque l'on désire faire établir le diagnostic expérimental pour un animal ayant succombé à une maladie que l'on soupçonne être le charbon.

L'expérience et la pratique ont montré que le procédé de Wulff convenait aussi bien pour le charbon que pour le diagnostic de diverses autres maladies septicémiques des animaux : typhose aviaire (Truche), choléra des poules (Staub), rouget du porc (Oberlander, Giovine (Altara).

## E

### EMPLOI DES PROCÉDÉS DE LA SÉROLOGIE.

De nombreux expérimentateurs ont tenté de résoudre la question du diagnostic du charbon bactérien par *la recherche du pouvoir agglutinant* du sérum des animaux infectés. Mais ce précieux procédé de diagnostic n'est pas applicable à l'infection charbonneuse en raison des propriétés du sérum de la plupart des espèces animales : très souvent le sérum des animaux sains agglutine les cultures de la bactérie charbonneuse à un taux élevé, quelques sérums sont capables même de dissoudre la bactérie. Ces propriétés ont pour conséquence dans l'application de la méthode des difficultés de technique qui n'ont pas encore été résolues (Lambotte et Maréchal, Bormano, Sobernheim, Carini...)

### Séro-précipitation — Procédé d'Ascoli.

Ascoli <sup>1</sup> a fait connaître les avantages de la *séro-précipitation* dans le diagnostic de l'infection bactérienne. Le

---

1. ASCOLI. Les précipitines dans le diagnostic du charbon bactérien. *Comptes-rendus de la Soc. de Biologie, Séance du 11 février 1911. T. LXX, p. 194.*

sérum des animaux hyperimmunisés contre la bactériodie charbonneuse acquiert la propriété de provoquer la formation d'un précipité lorsqu'il est mis en contact avec des émulsions de bactériodies charbonneuses recueillies sur gélose ou avec des extraits préparés avec le sang, la pulpe des organes, les liquides d'œdème ou les épanchements des animaux morts de charbon. La putréfaction n'entrave pas la production du phénomène et Ascoli a obtenu la réaction avec des organes d'animaux morts et enfouis depuis seize mois.

Le sérum précipitant est difficile à préparer, tous les animaux hyperimmunisés contre la bactériodie charbonneuse ne donnent pas un sérum précipitant. Longtemps Ascoli a possédé seul un sérum pouvant servir de réactif, le sérum anticharbonneux de Bürow, celui de Sobernheim ne donnaient pas de réaction.

### Contribution personnelle à l'étude de la réaction d'Ascoli.

C'est ici que se place notre contribution personnelle à l'étude du diagnostic expérimental du charbon bactériodien, elle a été limitée à l'emploi du procédé d'Ascoli.

En 1912 nous avons été aux prises avec une épidémie de fièvre charbonneuse sévissant sur les chevaux de plusieurs formations militaires alors cantonnées au camp de C...

Le fait pour être intéressant, n'était pas nouveau et chaque année le séjour au camp était marqué ou suivi de quelques cas de charbon bactériodien.

Pour qui était prévenu de l'existence de la maladie le diagnostic en était facile et l'autopsie permettait d'éliminer l'idée de coliques de congestion à laquelle se ralliaient volontiers les infirmiers vétérinaires.

---

1. A. ASCOLI. La precipitina nella diagnosi del carbonchio ematico. *La Clinica veterinaria*, 1911, n° 1.

Ergebnisse und Ausblicke der Thermoprälzipitin reaktion. *Virchows Archiv. f. Path. Anatomie und Physiologie*, 213, 1913.

Cependant pour quelques cas les lésions étaient si discrètes, la tuméfaction si peu accusée que nous voulûmes nous assurer par l'analyse bactériologique du diagnostic exact de l'affection à laquelle nous avions affaire.

Des autopsies tardives, des examens retardés ne tardèrent pas à nous convaincre que l'examen bactérioscopique, le seul auquel il nous était possible d'avoir recours, ne nous apportait pas le secours que nous en attendions. Bien souvent nos examens restaient infructueux ou leurs résultats étaient incertains.

Notre ami, M. Le Professeur Panisset, nous conseilla d'essayer le procédé d'Ascoli qui commençait à se répandre. Nous eûmes recours à la technique devenue classique (*ubi infra*) qui nous fut recommandée par M. le Professeur Panisset sous la forme qui est consignée dans le *Précis de microbiologie des maladies infectieuses*.

Nos essais encore peu nombreux furent vite interrompus à notre grand regret, le sérum précipitant nous était parcimonieusement délivré, en pipettes de petites dimensions, et notre provision ne tarda pas à s'épuiser.

Nous avons été gagné par la valeur des indications fournies par le procédé d'Ascoli et nous étions désireux de nous faire une opinion définitive sur le sujet ; sur les conseils de M. Le Professeur Panisset, qui l'avait utilisé quelquefois, nous remplaçâmes le sérum d'Ascoli par le sérum anticharbonneux de l'Institut Pasteur.

L'expérience avait prouvé que nombre d'échantillons du sérum anticharbonneux de l'Institut Pasteur était précipitant. Nos essais confirmèrent le fait.

Jusqu'alors le procédé d'Ascoli n'avait pu être qu'un procédé d'exception en raison de la difficulté de se procurer du sérum précipitant. Désormais, avec la possibilité d'employer le sérum anticharbonneux de l'Institut Pasteur, la séro-précipitation d'Ascoli allait devenir un procédé courant du diagnostic de la fièvre charbonneuse.

Dans ce problème si vaste du diagnostic expérimental de la fièvre charbonneuse, nous croyons pouvoir revendi-

quer d'avoir été l'un des plus modestes, parmi les artisans qui auront aidé à donner au procédé d'Ascoli un caractère plus général et plus pratique.

La recherche des précipitines exige l'emploi de liquides très clairs. Il est souvent nécessaire de filtrer le sérum sur bougie, les extraits d'organe obtenus par broyage dans l'eau physiologique sont agités avec du chloroforme et filtrés sur amiante ou sur bougie. Les substances qui dans les organes sont capables d'engendrer la formation du précipité, résistent non seulement à la putréfaction, mais encore à la chaleur. Le procédé le plus simple pour obtenir un liquide clair, est donc de porter à l'ébullition l'extrait dans l'eau physiologique et de filtrer sur papier.

Pour observer la réaction il suffit de mettre en contact, sans mélanger, le sérum précipitant et le liquide suspect convenablement préparé. Le phénomène se traduit par la formation immédiate, au niveau du contact des deux liquides, d'une zone de précipité. Avec les produits normaux on n'observe pas de réaction immédiate, ni après un quart d'heure de contact.

Par la suite, Ascoli a imaginé un appareil qui permet de faire la recherche avec plus de facilité et il a formulé les règles de son emploi :

Un tube à essai est rempli de solution physiologique. Après avoir ajouté quelques grammes de matériel suspect, on plonge le tube quelques minutes dans de l'eau bouillante. Après refroidissement, l'extrait est prêt pour la réaction zonale. On le verse dans le petit entonnoir d'un appareil imaginé par Ascoli qui rend presque automatique le procédé diagnostique. L'appareil se compose de deux parties :

1<sup>o</sup>. — Un petit tube en verre, à pied et à fond étranglé. Le tube contient, jusqu'à un trait, du sérum précipitant complètement limpide ; tout précipité se dépose dans l'étranglement et y est retenu.

2<sup>o</sup>. — Un petit entonnoir garni d'amiante, dont le tube

effilé se termine près du niveau du sérum en s'appuyant à la paroi du tube à pied.

L'extrait versé dans l'entonnoir est ainsi amené à se déposer nettement sur le sérum ; l'apparition de l'anneau se reconnaît avec facilité et précision.

Des travaux innombrables ont confirmé la valeur du procédé d'Ascoli ; J. Carneiro, dans sa thèse, en a fait une excellente revue critique.

Bierbaum est des premiers à confirmer les observations d'Ascoli ; cependant il croit pouvoir noter que la réaction peut faire défaut lorsque les bactériidies sont rares <sup>1</sup>.

Roncaglio affirme qu'il s'agit du plus simple et du plus sur des moyens du diagnostic. Lebre reconnaît sa spécificité discutée. Szymanowski et Zagaja se sont attachés à contrôler les indications fournies par l'analyse bactériologique avec ceux apportés par la thermoprécipitation d'Ascoli, comme Zwick et Fischøder, les résultats auxquels ils sont arrivés ne sont pas en faveur de la valeur du procédé. Fischøder avait enregistré une proportion élevée d'insuccès au passif de la méthode, en réalité il lui suffit de changer de sérum précipitant pour obtenir 100 pour 100 d'indications exactes. Finzi lui aussi a dénié toute valeur au procédé d'Ascoli auquel il ne reconnaît pas non plus la moindre spécificité <sup>2</sup>.

D'un ensemble d'observations personnelles et des expériences faites avant, Flemming <sup>3</sup> donne son appréciation

---

1. K. BIERBAUM. Beitrag zur Milzbranddiagnose mit Hilfe der Präzipitations methode. *Berl. tierärzt. Woch.* n° 12. 23 Mars 1911, pp. 202-204.

2. G. FINZI. Ueber die Spezifität und uber den diagnostischen Wert der « Thermopräzipitinreaktion » von Ascoli bei der Erkennung des hämatischen Karbunkels und des Rotlaufs. *Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Originale Band 68 Heft 5/6*.

3. FLEMMING. Séro-diagnostic du charbon bactéridien par la thermoprécipitation d'Ascoli. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 10, 17 et 24 Février 1912.

dans des conclusions dont les termes n'ont rien perdu de leur valeur :

1°. — La méthode d'Ascoli (sérum et extraits bactériens) est capable de donner un précipité, presque instantané dans les cas très nets et au plus tard au bout de cinq minutes.

2°. — Cette réaction est spécifique. Les matériaux qui ne contiennent pas de bactérie ne donnent aucun précipité même après un quart d'heure.

3°. — Cette réaction a lieu non seulement pour les extraits concentrés, mais encore pour les solutions très étendues ; celles-ci peuvent l'être plus ou moins selon la richesse bacillaire du produit examiné et peut-être aussi suivant le degré de virulence des bacilles. La température et la durée de la macération dans le sérum physiologique pour la préparation de la solution permettent aussi d'opérer avec des solutions plus ou moins concentrées. Flemming a encore obtenu des précipités à 1 p. 400.

4°. — Tous les organes d'animaux ayant succombé au charbon contiennent des substances précipitinogènes au même titre que la rate, et permettent d'obtenir la réaction.

5°. — Le tissu splénique à examiner n'a pas besoin d'être très frais. Même avec une rate en putréfaction on peut faire la réaction ; elle a été obtenue par Flemming avec une rate ayant séjourné vingt-deux jours à toutes les influences putréfiantes et il n'y a trouvé aucune différence avec celles qu'on obtient des tissus frais.

6°. — De plus, cette méthode permet d'obtenir un précipité avec des organes conservés dans l'alcool à 95° ou dans le formol pendant deux à cinq jours.

7°. — La réaction d'Ascoli est en même temps une thermoprécipitation car le chauffage des extraits contenant les précipitinogènes à 60 ou 100° n'entrave pas la réaction ultérieure.

8°. — Les différents sérums précipitent avec une intensité variable. Pratiquement, il ne faut employer qu'un

sérum que l'on a essayé auparavant et qui donne un précipité net et instantané.

De même, il faut toujours l'éprouver également en le faisant réagir sur des substances certainement indemnes de bactériidies. On fait aussi des réactions témoins avec une solution de chlorure de sodium et une autre de sérum normal. Ces tubes témoins permettent des comparaisons. En cas de réaction négative, il faut, avant de se prononcer, faire d'autres essais à différents titres de solution, pour écarter toute cause d'erreur.

Buiculesco <sup>1</sup> considère le procédé d'Ascoli comme capable de fournir des indications rapides et sûres. Il insiste plus particulièrement sur la possibilité de faire des extraits avec la rate, organe riche en bacilles et partant en précipitogène mais aussi avec la peau, les matières excrémentitielles, l'intestin, les muscles, le cœur, le foie, le rein, les ganglions, le sang, la moelle des os, le poumon.

Il arrive que la réaction semble positive avec des extraits concentrés de bacilles ressemblant au bacille du charbon, mais en diluant l'extrait 1/20, la réaction devient négative. Avec des extraits de bacilles de charbon la réaction est positive même 1/100. Cette question, déjà envisagée par Bierbaum, a été étudiée depuis par W. Pfeiler et Drescher <sup>2</sup>.

J. M. Quevedo et C. G. Maag <sup>3</sup> tirent de leurs recherches que le procédé est sensible et utile pour le diagnostic du charbon, Schnetz et Pfeiler <sup>4</sup> considèrent la méthode comme la plus sûre, son emploi n'empêcherait pas de

---

1. BUICULESCO. Diagnostic du charbon par la méthode Ascoli. *Archiva veterinaria*, Année XI, n° 5.

2. W. PFEILER et DRESCHER. Untersuchungen über die Beziehungen der Pseudomilzbrandbazillen und den Milzbranderregeren mittels der Präzipitations methode. *Zeitschrift für Infektions Krankheiten der Haustiere*, Band 13, Heft 7, 1913.

3. J. M. QUEVEDO et CONRADO, G. MAAG. — La séro-précipitation en el Carbunclo. *Revista Zootecnica*, An. IV, n° 40, 1912.

4. SCHUETZ ET PFEILER. — Nouvelles recherches sur le diagnostic du charbon au moyen de la méthode de précipitation. *Archiv. fur wissen-*

recourir aux autres procédés de diagnostic. Schnetz et Pfeiler donnent la préférence à l'extrait préparé à froid, simple ou chloroformé, ils le trouvent supérieur à l'extrait obtenu par ébullition.

Tempel admet que la réaction d'Ascoli est un moyen de diagnostic facile à utiliser ; en outre, elle conserve toute sa valeur quand on expérimente avec des matériaux qui ont subi un commencement de putréfaction, et elle permet de vérifier fructueusement les autres procédés de diagnostic mis en œuvre.

Néanmoins, on ne peut pas prétendre qu'elle soit dès à présent à la portée du praticien qui ne peut pas, dans ses occupations journalières, s'adonner à des travaux qui exigent un laboratoire <sup>1</sup>.

Bessemans et Leynen <sup>2</sup> opérant sur des organes normaux et sur des produits charbonneux, n'ont jamais trouvé le procédé en défaut. Ces expérimentateurs insistent sur la nécessité d'employer un extrait concentré et bien clarifié, sur l'utilité d'avoir des tubes témoins capables de renseigner, dans chaque réaction, sur la valeur et la spécificité du sérum précipitant.

Le procédé peut servir pour la recherche de l'infection charbonneuse des peaux importées <sup>3</sup>.

Les organes (guerrero) et les peaux des bovins vaccinés contre le charbon soit, par la méthode pasteurienne, soit par le procédé simultané de Sobernheim ne renfer-

---

*chaftliche und praktische Tierheilkunde, T. 40, Fasc. 5 et 6, Mai 1914.*

PFEILER. — Der Nachweis des Milzbrandes mittelst der Präzipitationsmethode. *Berliner tierärztliche Wochenschrift* n° 9 et 10, 1912.

1. TEMPEL. — La réaction d'Ascoli convient-elle dans la pratique pour les vétérinaires ? *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 19<sup>e</sup> Juillet 1913.

2. A. BESSEMANS et E. LEYNEN. Recherches sur le diagnostic de laboratoire du charbon bactérien. *Annales de médecine vétérinaire, Bruxelles, Août-Septembre 1922.*

3. Müssemeier, Francke, Standfuss et Schnauldt. Untersuchungen über den milzbrandnachweis an Häuten mittels der Präzipitation *Arch. f. wiss. u. Prakt. Tierheilk. S. 7, Heft 5, p. 530, 1924.*

ment pas de précipitogène charbonneux. La réaction d'Ascoli conserve de ce fait toute sa valeur pour la recherche du charbon dans les peaux importées qu'elles soient fraîches ou sèches, salées ou non. Dans ces cas les extraits chloroformiques ont un pouvoir antigène plus marqué que les extraits aqueux mais ceux-ci peuvent suffire.

La recherche de l'antigène par la *méthode de déviation du complément* peut être mise en œuvre pour le diagnostic du charbon bactérien <sup>1</sup>.

Ce procédé a été utilisé surtout par Djoubelieff <sup>2</sup> et c'est à ses travaux que nous emprunterons la technique à employer et les résultats que l'on peut en attendre.

Les organes employés de préférence dans ce but étaient la rate et le foie. Après les avoir émulsionnés dans dix fois environ leur poids d'eau physiologique à 9 p. 1000, on laisse reposer vingt-quatre heures ou on centrifuge ; puis, on décante le liquide. Ce liquide sera employé, pour la réaction, en nature ou dilué dans de l'eau physiologique s'il n'est pas suffisamment clair.

Comme anticorps Djoubelieff a employé du sérum anti-charbonneux de l'Institut Pasteur et le sérum anticharbonneux de l'Institut sérothérapique de Bucarest.

*Technique.* — Dans une série de cinq tubes à hémolyse, numérotés de 1 à 5, on introduit des quantités croissantes d'antigène (le liquide obtenu par l'émulsion de la rate ou du foie) en commençant par 1, puis 2, 3, 4 et 5 c. c. Les mêmes quantités d'antigène sont introduites

---

1. K. BIERBAUM et W. KRAUSE. Über das Vorkommen von Milzbrandpräzipitinogen in der Haut gegen Milzbrand schutzgeimpfter Rinder.

2. A. REINSTORF. — Ist in der Haut von Rindern, die gegen Milzbrand schutzgeimpft sind, milzbrandantigen durch die Ascolireaktion nachweisbar.

*Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk* 52 H. 6, p. 572, 1925.

2. S. DJOUBELIEFF. Diagnostic expérimental du charbon bactérien par la déviation du complément. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, Mars 1912, T. LXXII p. 450.

dans une deuxième série de cinq tubes (n° 6 à 10). On met dans chacun des dix tubes la quantité nécessaire d'alexine (d'après le titrage). Puis on ajoute 1 c. c. de sérum anticharbonneux dans chacun des cinq tubes de la première série. Deux autres tubes-témoins contiennent : le premier, l'alexine seule ; le second, « l'alexine + 1 c. c. de sérum anticharbonneux ». Le contenu de tous les tubes est ramené à 1 c. c. avec de l'eau physiologique à 9 p. 1000 ; on mélange bien en agitant et on met le tout à l'étuve à 37° pendant une heure et demie environ. Au bout de ce temps, on retire les tubes de l'étuve, et on ajoute dans chaque tube 1 c. c. de globules rouges sensibilisés pendant une heure à la température de la chambre par le sérum hémolytique correspondant, ou on ajoute 1 c. c. de globules rouges non sensibilisés et 1 c. c. d'une dilution déterminée par le titrage du sérum hémolytique correspondant. On ramène à 3 c. c. avec de l'eau physiologique et on remet à l'étuve. Au bout d'une demi-heure, on retire les tubes de l'étuve et on observe.

Toutes les fois que les organes employés proviennent d'un animal mort de charbon, il y a hémolyse totale ou presque totale dans les tubes 6 à 12, c'est-à-dire dans les tubes ne contenant pas d'anticorps et dans les tubes témoins (alexine seule ou « alexine + anticorps ») et absence d'hémolyse ou déviation du complément dans les tubes contenant l'émulsion à examiner (l'antigène) + l'anticorps. Ceci indique que l'antigène examiné provient bien d'un animal charbonneux, puisque seul le mélange « antigène + anticorps » correspondant fixe entièrement l'alexine ou autrement dit, dévie le complément.

Djoubelieff n'a pas manqué de contrôler la spécificité de la réaction, en utilisant, d'une part, pour des antigènes charbonneux, des anticorps non charbonneux, comme le sérum normal et le sérum anticholérique, et de l'autre, le sérum anticharbonneux comme anticorps pour des antigènes sûrement non charbonneux, soit encore en employant comme antigène des cultures de charbon bactérien et

des cultures de germes lui ressemblant, comme l'anthracoïde.

Dans tous les cas, les résultats furent extrêmement rigoureux et indiquèrent la parfaite valeur spécifique de la méthode.

Les organes qui ont servi comme antigène avaient été prélevés de un à quinze jours après la mort des animaux inoculés avec du charbon et accusaient, à l'examen microscopique, une richesse plus ou moins grande, même une absence totale de bactériidies, selon le moment de l'autopsie.

---



## CONCLUSIONS

Si le diagnostic du charbon bactéridien peut être assuré par les moyens les plus simples de l'analyse bactériologique, le plus souvent, par contre, il est nécessaire de mettre en œuvre tous les artifices de la méthode expérimentale. La multiplicité des méthodes et la complexité des procédés recommandés suffiraient, s'il en était besoin encore, à convaincre de la difficulté du problème.

I. — Lors des autopsies pratiquées peu de temps après la mort l'examen bactérioscopique aidé par la mise en évidence des caractères histochimiques de la bactériodie permet d'assurer le diagnostic de fièvre charbonneuse.

II. — La destruction rapide de la bactériodie charbonneuse dans les cadavres laisse souvent l'examen bactérioscopique infructueux, cependant la réaction au bleu de méthylène de Mac Fadyean permet de mettre en évidence des éléments qui proviennent de la gaine de la bactériodie et dont la constatation peut assurer le diagnostic.

III. — Les cultures peuvent aider à l'identification lorsque les éléments mis en évidence ressemblent aux bacilles pseudocharbonneux. A la vérité, la différenciation des bacilles pseudocharbonneux et de la bactériodie n'est pas toujours facile, le plus souvent la culture est insuffisante pour l'assurer.

IV. — La démonstration du caractère pathogène des microbes rencontrés à l'examen microscopique et développés dans les cultures, est un moyen certain du diagnostic. Les indications positives ont une valeur absolue. Le procédé est en défaut lorsque l'on inocule des produits

altérés, l'inoculation cutanée ne remédie qu'en partie aux imperfections du procédé.

V. — La séro-précipitation d'Ascoli n'apporte qu'une preuve indirecte de la présence de la bactériémie dans les produits soumis à l'examen. L'expérience confirme que cette preuve a une grande valeur et nos recherches nous ont convaincu du parti qu'il était possible de tirer du procédé d'Ascoli.

VI. — Le choix du sérum précipitant et la difficulté d'obtenir un bon sérum semblaient devoir limiter les applications de la réaction d'Ascoli. En réalité, nos essais établissent que le sérum anticharbonneux de l'Institut Pasteur convient pour la recherche de la précipitation. L'emploi de ce sérum est d'un usage courant dans les laboratoires où l'on pratique la détection de la fièvre charbonneuse.

VII. — Les soins apportés à la récolte et à la conservation des produits suspects facilitent la tâche du laboratoire et simplifient le choix des artifices à mettre en œuvre.

Le prélèvement d'un os à moelle est à coup sûr le mode le plus simple et le plus sûr d'aboutir à un diagnostic exact, même avec des produits recueillis depuis longtemps.

VIII. — La méthode de déviation du complément peut fournir d'utiles indications, mais la complexité de sa technique limite son emploi.

---

Vu : *Le Président de Thèse,*  
BEZANÇON.

Vu : *Le Doyen,*  
H. ROGER.

Vu et permis d'imprimer :  
*Le Recteur de l'Académie de Paris,*  
P. APPELL.

---

## TABLE DES MATIÈRES

---

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| AVANT-PROPOS . . . . .                                                                          | 9  |
| A. — Recherche directe de la bactériémie . . . . .                                              | 11 |
| Mise en évidence de la gaine . . . . .                                                          | 12 |
| Présence de formes bactériennes analogues à la bactériémie charbonneuse . . . . .               | 18 |
| Bacilles Anthracoides . . . . .                                                                 | 19 |
| B. — Inoculation expérimentale . . . . .                                                        | 23 |
| C. — Culture dans les milieux artificiels . . . . .                                             | 26 |
| D. — Conditions de la récolte, de la conservation et de l'envoi des produits suspects . . . . . | 28 |
| E. — Emploi des procédés de la sérologie . . . . .                                              | 37 |
| Séro-précipitation. Procédé d'Ascoli . . . . .                                                  | 37 |
| Contribution personnelle à l'étude de la réaction d'Ascoli . . . . .                            | 38 |
| CONCLUSIONS . . . . .                                                                           | 49 |

---

IMPRIMÉ PAR DESCLÉE, DE BROUWER ET C<sup>ie</sup>

41, RUE DU METZ, LILLE. — 3.488



